

17 JUN 2005

PCT/JP03/16014,

15.12.03

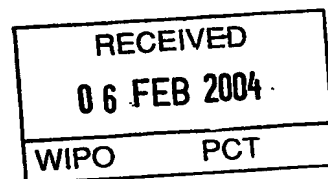
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月19日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-368360
[ST. 10/C]: [JP2002-368360]



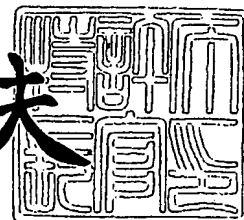
出 願 人
Applicant(s): 三井化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月23日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3112490

【書類名】 特許願
【整理番号】 P0001667
【提出日】 平成14年12月19日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 9/88
C12N 1/21
C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内

【氏名】 八巻 俊文

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内

【氏名】 的石 かおり

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市長浦 5 8 0 - 3 2 三井化学株式会社内

【氏名】 番場 伸一

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内

【氏名】 伊藤 潔

【特許出願人】

【識別番号】 000005887

【氏名又は名称】 三井化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なニトリルヒドラーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 α サブユニットと β サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼにおいて、

前記 α サブユニットが、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラーゼ。

【請求項2】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項1に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項3】 前記 β サブユニットが配列表の配列番号：2のアミノ酸配列を有する請求項1または2に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項4】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸にさらに置換されている請求項3に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項5】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項4に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項6】 前記 β サブユニット及び前記 α サブユニットの少なくとも一方の有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項1～5に記載のニトリルヒドラーゼ。

【請求項7】 α サブユニットと β サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼ

ターゼにおいて、

β サブユニットが、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラターゼ。

【請求項8】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項7に記載のニトリルヒドラターゼ。

【請求項9】 前記 α サブユニットが、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有する請求項7または8に記載のニトリルヒドラターゼ。

【請求項10】 前記 α サブユニットの36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている請求項9に記載のニトリルヒドラターゼ。

【請求項11】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項10に記載のニトリルヒドラターゼ。

【請求項12】 前記 α サブユニット及び前記 β サブユニットの少なくとも一方有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラターゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項7～11に記載のニトリルヒドラターゼ。

【請求項13】 ニトリルヒドラターゼの α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、

前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

【請求項14】 前記アミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番

目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項13に記載の遺伝子。

【請求項15】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項13または14に記載の遺伝子。

【請求項16】 配列表の配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目及び610番目から612番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項13に記載の遺伝子。

【請求項17】 前記塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項16に記載の遺伝子。

【請求項18】 ニトリルヒドラーゼの β サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、

前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である遺伝子。

【請求項19】 前記アミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項18に記載の遺伝子。

【請求項 20】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 18 または 19 に記載の遺伝子。

【請求項 21】 配列表の配列番号：4 記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 番目から 480 番目、556 番目から 558 番目及び 649 番目から 651 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 18 に記載の遺伝子。

【請求項 22】 前記塩基配列の 58 番目から 60 番目、61 番目から 63 番目、322 番目から 324 番目、598 番目から 600 番目及び 634 番目から 636 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 21 に記載の遺伝子。

【請求項 23】 ニトリルヒドラーゼの α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と β サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

前記 α サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列の 36 番目、71 番目、148 番目及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

【請求項 24】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の 6 番目、19 番目、38 番目、77 番目、90 番目、102 番目、106 番目、126 番目、130 番目、142 番目、146 番目、187 番目、194 番目及び 203 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 23 に記載の遺伝子。

【請求項 25】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸

置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項23または24に記載の遺伝子。

【請求項26】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目及び610番目から612番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項23に記載の遺伝子。

【請求項27】 前記塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項26に記載の遺伝子。

【請求項28】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列が配列表の配列番号：2のアミノ酸配列である請求項23～27のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項29】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列が、前記配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項23～27のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項30】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項29に記載の遺伝子。

【請求項31】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項29または30に記載の遺伝子。

【請求項 32】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号: 4 の塩基配列を有する請求項 28 に記載の遺伝子。

【請求項 33】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号: 4 に記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 番目から 480 番目、556 番目から 558 番目及び 649 番目から 651 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 29 に記載の遺伝子。

【請求項 34】 前記塩基配列の 58 番目から 60 番目、61 番目から 63 番目、322 番目から 324 番目、598 番目から 600 番目及び 634 番目から 636 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 33 に記載の遺伝子。

【請求項 35】 ニトリルヒドラーゼの α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と β サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

前記 β サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号: 2 のアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

【請求項 36】 前記アミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 35 に記載の遺伝子。

【請求項 37】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 35 または 36 に記載の遺伝子。

【請求項 38】 前記 β サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列表の配列番号：4 記載の塩基配列の 28 番目から 30 番目、94 番目から 96 番目、109 番目から 111 番目、121 番目から 123 番目、136 番目から 138 番目、142 番目から 144 番目、151 番目から 153 番目、214 番目から 216 番目、352 番目から 354 番目、379 番目から 381 番目、436 番目から 438 番目、478 番目から 480 番目、556 番目から 558 番目及び 649 番目から 651 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 35 に記載の遺伝子。

【請求項 39】 前記塩基配列の 58 番目から 60 番目、61 番目から 63 番目、322 番目から 324 番目、598 番目から 600 番目及び 634 番目から 636 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項 38 に記載の遺伝子。

【請求項 40】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列を有する請求項 35～39 のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項 41】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1 のアミノ酸配列の 36 番目、71 番目、148 番目及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項 35～39 のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項 42】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の 6 番目、19 番目、38 番目、77 番目、90 番目、102 番目、106 番目、126 番目、130 番目、142 番目、146 番目、187 番目、194 番目及び 203 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項 41 に記載の遺伝子。

【請求項 43】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1 個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項 41 または 42 に記載の遺伝子。

【請求項 44】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3 の塩基配列を有する請求項 40 に記載の遺伝子。

【請求項 45】 前記 α サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3 の塩基配列の 106 番目から 108 番目、211 番目から 213 番目、442 番目から 444 番目及び 610 番目から 612 番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 41 に記載の遺伝子。

【請求項 46】 前記塩基配列の 16 番目から 18 番目、55 番目から 57 番目、112 番目から 114 番目、229 番目から 231 番目、268 番目から 270 番目、304 番目から 306 番目、316 番目から 318 番目、376 番目から 378 番目、388 番目から 390 番目、424 番目から 426 番目、436 番目から 438 番目、559 番目から 561 番目、580 番目から 582 番目及び 607 番目から 609 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項 45 に記載の遺伝子。

【請求項 47】 請求項 1～12 のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 48】 前記ニトリルヒドラーゼの α サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：3 の塩基配列または請求項 13～16 のいずれかに記載の遺伝子である請求項 21 に記載のプラスミド。

【請求項 49】 前記ニトリルヒドラーゼの β サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：4 の塩基配列または請求項 17～19 のいずれかに記載の遺伝子である請求項 21 または 22 に記載のプラスミド。

【請求項 50】 請求項 23～46 のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

【請求項 51】 前記ニトリルヒドラーゼの宿主細胞での発現のための構成を有する請求項 47～50 のいずれかに記載のプラスミド。

【請求項 52】 請求項 51 に記載のプラスミドによって宿主細胞を形質転換して得られた形質転換体。

【請求項 53】 ニトリルヒドラーゼの生産方法において、
請求項 52 に記載の形質転換体を培地で培養して、該形質転換体に前記プラスミドの有するニトリルヒドラーゼ遺伝子に基づくニトリルヒドラーゼを生産

させる工程を有することを特徴とする生産方法。

【請求項 54】 前記培養後の形質転換体、培養液及びそれらの処理物からニトリルヒドラーゼを回収する工程を更に有する請求項 53 に記載の生産方法。

【請求項 55】 ニトリル化合物を水性媒体中でニトリルヒドラーゼを接触させて対応するニトリル化合物を得るニトリル化合物の製造方法において、

前記ニトリルヒドラーゼが請求項 1～12 のいずれかに記載のものであることを特徴とする製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なニトリルヒドラーゼ及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いてニトリルヒドラーゼを産生する方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、種々の化合物のニトリル基を水和によりアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラーゼが発見され、該酵素を産生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラーゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げることが重要である。より具体的には、酵素調製物の単位重量あたりの該酵素含有量を高くする必要がある。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みが為されている。

【0003】

ニトリルヒドラーゼ活性を有する微生物としては、シュードノカルディア・サーモフィラ（本菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設（埼玉県和光市広沢

2-1) に番号 JCM3095 として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。) が見い出されている (特許文献 1 参照)。

【0004】

また、同株よりニトリルヒドラーゼが単離され、同酵素が α サブユニット及び β サブユニットより構成されることが確認されている。そして、同株よりニトリルヒドラーゼ遺伝子が単離され、そのアミノ酸配列及び塩基配列を明らかにされるとともに、同酵素の機能を実質的に変化させない置換変異部位を有するニトリルヒドラーゼが見い出された。さらに、このニトリルヒドラーゼを形質転換体内で大量に発現できるプラスミド及び同プラスミドにより形質転換された細胞株 (一例として MT-10822: ブタペスト条約に則って、受託番号 FERMBP-5785 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。) が作出された。加えて、該細胞株による該ニトリルヒドラーゼの生産及び該細胞株若しくはそれより得られる該ニトリルヒドラーゼをニトリル化合物と接触させる事による対応するアミド化合物の製造が可能となっている (特許文献 2 参照)。

【0005】

しかし、ニトリルヒドラーゼの機能を実質的に変化させない置換変異部位が該公報に記載されているもの以外に存在するのか、存在するならばその置換変異部位は遺伝子配列上の何処に相当する部位であるかに関しては未だ明らかとなっていないかった。

【0006】

【特許文献 1】

特開平 8-56684 号公報

【特許文献 2】

特開平 9-275978 号公報

【特許文献 3】

特開平 11-253168 号公報

なお、ニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を宿主細胞で発現させて酵素活性のあるニトリルヒドラーゼを生産する場合にこの酵素の活性化に参与する

タンパク質が存在する点が特許文献3に開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、機能を実質的に変化させない新規な置換変異部位を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する事である。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いた該酵素の産生方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法をも提供する事である。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはかかる状況の下、特開平9-275978号公報に開示されているニトリルヒドラーゼ遺伝子に、該公報には開示されていない新規な置換変異部位を導入し、該変異導入後の該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製した。また、該細胞株を用いた該酵素の産生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造に関しても鋭意検討を重ねた結果、本願発明を完成させるに至った。

【0009】

本発明にかかるニトリルヒドラーゼの α サブユニットは、配列番号: 1に示される α サブユニットのアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目、及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0010】

本発明にかかるニトリルヒドラーゼの β サブユニットは、配列表の配列番号: 2に示す β サブユニットのアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有すること

を特徴とする。

【0011】

本発明にかかるニトリルヒドラターゼは、 α サブユニットと β サブユニットを有し、これらのサブユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

【0012】

本発明にかかるニトリルヒドラターゼの α サブユニットをコードする遺伝子は、上記の α サブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

【0013】

本発明にかかるニトリルヒドラターゼの β サブユニットをコードする遺伝子は、上記の β サブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

【0014】

本発明にかかるニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子は、 α サブユニットをコードする遺伝子と β サブユニットをコードする遺伝子とを有し、これらのサブユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

【0015】

本発明のプラスミドは、上記の遺伝子のいずれかを有することを特徴とする。

【0016】

本発明の形質転換体は、上記のプラスミドを用いて宿主細胞を形質転換することに得られたものであることを特徴とする。

【0017】

本発明のニトリルヒドラターゼの製造は、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、または該形質転換体や該培養液の処理物からニトリルヒドラターゼを回収する工程を有することを特徴とする。

【0018】

本発明のアミド化合物の製造方法は、水性媒体中でニトリル化合物を上記のニトリルヒドラターゼとを接触させて該ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変

換する工程を有することを特徴とする。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について更に詳細に説明する。

【0020】

本発明のニトリルヒドラーゼは、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼに変異を導入して得られたものである。具体的には、配列表の配列番号：1及び2に示すアミノ酸配列の所定の部位の少なくとも1つ以上におけるアミノ酸を他のアミノ酸で置換したものにより基本的に構成される。すなわち、本発明は、配列表の配列番号：1に示される205個のアミノ酸の配列により表される α サブユニットの内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラーゼ、配列表の配列番号：2に示される233個のアミノ酸の配列により表される β サブユニットの構成アミノ酸計438個の内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラーゼ及びその両方を構成要素とするニトリルヒドラーゼを含んでいる。

【0021】

本発明のニトリルヒドラーゼに用いられる具体的なアミノ酸配列には、以下のものが含まれる。

- (a-0) 配列番号：1の α サブユニットのアミノ酸配列
- (a-1) 配列番号：1に示される α サブユニットのアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目、及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列
- (a-2) 配列表の配列番号：1に示される α サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目、及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列
- (b-0) 配列表の配列番号：2に示される β サブユニットのアミノ酸配列

(b-1) 配列表の配列番号: 2 に示す β サブユニットのアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(b-2) 配列表の配列番号: 2 に示す β サブユニットのアミノ酸配列の 20 番目、21 番目、108 番目、200 番目、及び 212 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

上記の各変異は、変異前のニトリルヒドラーゼ活性を少なくとも維持し得るものである。

【0022】

本発明のニトリルヒドラーゼは、上記の (a-0) ~ (b-2) から選択されたアミノ酸配列を有する以下の構成要素からなる。

(A-1) α サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-2) α サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B-1) β サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B-2) β サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-3) α サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-4) α サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-5) α サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニ

リルヒドラーゼ

(A-6) α サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-7) α サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-8) α サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-9) α サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(A-10) α サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B-3) α サブユニットが上記の (a-0) のアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B-4) α サブユニットが上記の (a-0) のアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

(B-5) α サブユニットが上記の (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 β サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラーゼ

なお、上記の特定された変異部位以外のアミノ酸については、上記の特定部位の変異による目的とするニトリルヒドラーゼ活性を損なわない範囲内で、アミノ酸の置換、挿入、欠失が生じてよい。

【0023】

本発明においてニトリルヒドラーゼ遺伝子には、ニトリルヒドラーゼの α

配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

【0028】

また、配列番号：3を基礎とした場合の上記（a-2）の変異は、配列番号：3の塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目、及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

【0029】

一方、配列番号：4を基礎とした場合の上記（b-1）の変異は、配列番号：4の塩基配列の28番目から30番目、94番目から96番目、109番目から111番目、121番目から123番目、136番目から138番目、142番目から144番目、151番目から153番目、214番目から216番目、352番目から354番目、379番目から381番目、436番目から438番目、478番目から480番目、556番目から558番目、及び649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

【0030】

また、配列番号：4を基礎とした場合の上記（b-2）の変異は、配列番号：4の塩基配列の58番目から60番目、61番目から63番目、322番目から324番目、598番目から600番目、及び634番目から636番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

【0031】

これらの置換は、各遺伝子がコードする α 及び β サブユニットの少なくとも一方が組み込まれたニトリルヒドラーゼの活性が置換前の状態を維持、またはそれよりも向上するような範囲内で行われる。なお、変異導入手段に関しては特に

限定されない。

【0032】

本発明のニトリルヒドラーゼ遺伝子における上記の (a-1)、(a-2)、(b-1) 及び (b-2) の変異部位以外の部位については、それがニトリルヒドラーゼ活性を有するタンパク質の鑄型として機能できる範囲内で、塩基の置換、挿入または削除による更なる変異を有するものでもよい。

【0033】

このような更なる変異については以下のような例をあげることができる。ある一定の塩基配列を有する遺伝子を鑄型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主細胞の種類や培養に使用する栄養培地の成分や組成若しくは培養時の温度や pH 等によっては、遺伝子発現後の宿主細胞内酵素による修飾などにより、所期の酵素作用は保持しているものの配列表における N 末端付近のアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が欠失したり、N 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が新たに付加した異型体を産生する事があり得る。その為、そのような異型なニトリルヒドラーゼも本発明に含まれるものとする。

【0034】

一方、本発明のニトリルヒドラーゼ生産用のプラスミドは上記のニトリルヒドラーゼ遺伝子を用いて調製することができる。具体例としては以下のものを挙げることができる。

(P-1) 先に挙げた (a-1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-2) 先に挙げた (a-1) 及び (a-2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-3) 先に挙げた (b-1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-4) 先に挙げた (b-1) 及び (b-2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；及び

(P-5) 先に挙げた (A-1) ~ (B-4) のいずれかのニトリルヒドラーゼをコードする塩基配列を有するプラスミド。

【0035】

また、本発明にかかる形質転換体または細胞株は、このプラスミドを用いて任意の宿主細胞を形質転換して得られたものである。本発明のニトリルヒドラーゼの生産方法は、上記の形質転換体や細胞株を培養してニトリルヒドラーゼを産生させる工程を有する。また、本発明のアミド化合物の製造方法は、このようなニトリルヒドラーゼを産生する形質転換体や細胞株を培養して得られる培養液、細胞または細胞処理物を媒体中にてニトリル化合物と接触させて対応するアミド化合物を製造させる工程を有する。

【0036】

本発明におけるプラスミドは、ニトリルヒドラーゼの α サブユニットをコードする遺伝子、 β サブユニットをコードする遺伝子またはニトリルヒドラーゼ遺伝子に加え、各遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域などの、任意の宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体や細胞株によるニトリルヒドラーゼの産生を可能せしめる構成を有することができる。ここでいう任意の宿主細胞とは、後述の実施例の様にその一例として大腸菌が挙げられるが、これに限定されるものではなく、枯草菌等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物も用いる事ができる。

【0037】

発現に必要な制御領域としては、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む。）、リボゾーム結合配列（SD配列）、転写終結配列等を挙げることができる。具体的なプロモーター配列の例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンの *trp* プロモーター、ラクトースオペロンの *lac* プロモーター、ラムダファージ由来の *PL* プロモーター及び *PR* プロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター（*gnt*）、アルカリプロテアーゼプロモーター（*apr*）、中性プロテアーゼプロモーター（*npr*）、 α -アミラーゼプロモーター（*amy*）等が挙げられる。また、*tac* プロモーターや *trc* プロモーターのように人為的に設計・改変された配列も利用できる。

【0038】

リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来や枯草菌由来又はシュードノカルデ

イア本来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主細胞内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。たとえば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成してこれを利用してもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター・trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域のプラスミド上での配列順序は、プロモーター配列とリボゾーム結合配列はニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子より5'末端側上流に位置する事が望ましく、転写終結配列はニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子より3'末端側下流に位置する事が望ましい。また、その様な制御領域により α サブユニット遺伝子及び β サブユニット遺伝子が各々独立のシストロンとして発現されてもよいし、共通の制御領域によりポリシストロンとして発現されてもよい。

【0039】

以上の要件を満たしているプラスミドベクターの例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、pBluescript、pKK223-3、pSC101や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有しているpUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105等を挙げる事ができる。また、2種類以上の宿主細胞内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7を挙げる事ができる。

【0040】

このようなプラスミドベクターに本発明のニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子を該ニトリルヒドラターゼの活性発現に必要な領域と共に挿入して本発明のプラスミドを構築する方法、該プラスミドを所望の宿主細胞に形質転換する方法及び該形質転換体内でニトリルヒドラターゼを産生させる方法には、例えば「Molecular Cloning 3rd Edition」(J. Sambrookら; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)等に記載されている分子生物学・生物学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法と宿主細胞が利用できる。

【0041】

なお、宿主細胞が微生物の場合、該形質転換体を培養する培地としてLB培地やM9培地などが一般的に用いられるが、より好ましくはそのような培地成分にFeイオン及びCoイオンを $0.1 \mu\text{g/mL}$ 以上存在させるとよく、該形質転換体を植菌した後、適当な培養温度（一般的には、 $20^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ ）で生育させればよい。

【0042】

本発明のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を発現させて所望の酵素活性を有するニトリルヒドラーゼを生産する場合、該ニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子が必要となる。

【0043】

このニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質とは、該タンパク質の発現の有無が、ニトリルヒドラーゼの活性化を直接左右する性質を有しているタンパク質の事であり、特開平11-253168号公報に記載されるシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ活性化に関与するタンパク質（ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質）をその代表例として挙げる事が出来る。具体的には、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質としては、配列番号：5のアミノ酸配列に示される144個のアミノ酸の配列により構成されるものをその代表例として挙げる事が出来る。また、配列番号：5のアミノ酸配列の一部でのアミノ酸の置換、欠失、削除または挿入により得られた異型タンパク質も、ニトリルヒドラーゼの活性化に関与するものであれば、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質に含まれるものとする。この異型タンパク質としては、配列番号5のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸の欠失、置換または付加による変異を有し、ニトリルヒドラーゼの活性化に関与する性質を維持しているものを挙げる事ができる。

【0044】

ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子としては、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではない。この遺伝子としては、上記の配列番号：5のアミノ酸配列をコード

する塩基配列を有する遺伝子及び上記の異型タンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。更に、このニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号：6の塩基配列を有する遺伝子を挙げる事が出来る。更に、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子には、配列番号：6に記載の塩基配列配列の1個または2個以上について塩基の置換、欠失、削除又は挿入が行われた配列であっても、それがニトリルヒドラーゼの活性化に関与するタンパク質の鋳型として機能する場合には、ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

【0045】

ニトリルヒドラーゼ活性化タンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子組換え技術を用いたニトリルヒドラーゼの生産に利用するプラスミド中に、 α サブユニットをコードする遺伝子及び β サブユニットをコードする遺伝子とともに組み込まれることが好ましい。その場合におけるこれらのプラスミド上における順序は特に限定されず、また、3つの遺伝子が同一の制御領域により制御されてもよく、2つの遺伝子が同一の制御領域により制御され、残る1つの遺伝子が他の2つとは異なる制御領域により制御されてもよく、3つの遺伝子が各々異なる制御領域により制御されてもよい。

【0046】

本発明のニトリルヒドラーゼ又はニトリルヒドラーゼ活性を有する形質転換体を利用して、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造するには、所望のニトリル化合物を、ニトリルヒドラーゼ酵素精製物や粗酵素調製物、該形質転換体の培養液、培養液から得られる形質転換体又は形質転換体の処理物と水性媒体中で接触させればよい。ここでいう処理物とは、該形質転換体からの抽出物や磨砕物、これらの抽出物や磨砕物のニトリルヒドラーゼ活性画分を分離して得られる粗酵素調製物や更に精製して得られる酵素精製物などの後分離物、該形質転換体や該形質転換体の抽出物、磨砕物または後分離物を適当な手段を用いて固定化した固定化物の事を示している。接触させる温度は特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラーゼが失活しない温度範囲内であり、より好ま

しくは0℃～60℃である。ニトリル化合物としては、本発明のニトリルヒドラーゼが基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、好ましくはアセトニトリル、プロピオニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、*n*-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、クロトノニトリル、 α -ヒドロキシイソブチロニトリル等といった炭素数2～4のニトリル化合物がその代表例として挙げられる。該ニトリル化合物の水性媒体中での濃度は、特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラーゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは0℃～50℃である。

【0047】

【実施例】

以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。

【0048】

[参考例1] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1)

α サブユニットの6番目のLeuをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の参考例では、基本的にキットの原理及び操作方法を踏襲した。

【0049】

30 mLの試験管に10 mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養液1 mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000 rpm×5分)により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

【0050】

各々10 ngのpP T-D B 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 7記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100 (宝酒造社製) を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50 μ Lの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5 μ Lずつ含む全量47.5 μ Lのアニーリング溶液 (組成はキットに記載の条件による) を調製し、熱変性処理 (98 $^{\circ}$ C) を10分間行った後、37 $^{\circ}$ Cまで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37 $^{\circ}$ Cで15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTaKaRa LA Taqを0.5 μ L加えて72 $^{\circ}$ Cで3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol加えて全量を50 μ Lとした後、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応No. 3を行った。PCR反応No. 3の反応終了液5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用; アガロース濃度0.8重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2 KbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片 (約0.1 g) を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ Cで1時間保温してアガロースを完全に融解させ

た。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。精製した約2 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpPT-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7 KbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。この様にして得られた約2 kbと約2.7 KbのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 1を得た。

【0051】

得られた形質転換体を用いたアミド化合物の製造における転化率及び選択率を以下の方法により求めた。

【0052】

500 mLのバッフル付三角フラスコに40 μ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 μ g/mLの塩化コバルト・二水和物を含む100 mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、形質転換体No. 1を一白金耳植菌し、37℃・130 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液から遠心分離（5000 G×15分）により菌体を分離した。続いて、分離した該菌体を50 mLの生理食塩水に再懸濁した後に、再度遠心分離（5000 G×15分）により菌体を分離した。該菌体0.1 gを20 mLの50 mMリン酸カリウム水溶液（pH 7.0）に懸濁し、これに1 mLのアクリロニトリル又はメタアクリロニトリルを添加して10℃で緩やかに攪拌しながら1時間

反応させた。反応終了後、HPLCを用いて反応液の分析を行った結果、反応液中には添加したニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）に相当するモル量のアミド化合物（アクリルアミド又はメタアクリルアミド）のみが存在しており、ニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）及び対応する有機酸（アクリル酸又はメタアクリル酸）の存在は認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は100%であった。

【0053】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表1に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがMetに置換されていた。

【0054】

【表1】

表1

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 1 | α -6番目 | Leu | Met | CTG | ATG |

〔参考例2〕 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（2）

α サブユニットの6番目のLeuをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：11記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を

記載)を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、PCR反応No. 2を含む参考例1における操作と全く同じ操作により、形質転換体No. 2を得た。

【0055】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、100%であった。

【0056】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表2に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがThrに置換されていた。

【0057】

【表2】

表2

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 2 | α -6番目 | Leu | Thr | CTG | ACG |

〔参考例 3〕 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3)

α サブユニットの 6 番目の L e u を A l a に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0058】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号: 12 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 3 を得た。

【0059】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0060】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 3 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの α サブユニットの 6 番目の L e u が A l a に置換されていた。

【0061】

【表 3】

表 3

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 3 | α -6番目 | L e u | A l a | C T G | G C G |

【参考例 4】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (4)
 α サブユニットの 6 番目の L e u を V a l に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0062】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 13 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 4 を得た。

【0063】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0064】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表4に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがValに置換されていた。

【0065】

【表4】

表4

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 4 | α -6番目 | Leu | Val | CTG | GTG |

【参考例5】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5)

α サブユニットの19番目のAlaをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0066】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 14記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反

応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 5を得た。

【0067】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0068】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表5に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの19番目のAlaがValに置換されていた。

【0069】

【表5】

表5

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 5 | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |

【参考例6】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（6）

α サブユニットの38番目のMetをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0070】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

15記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 6を得た。

【0071】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0072】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表6に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの38番目のMetがLeuに置換されていた。

【0073】

【表6】

表6

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 6 | α -38番目 | Met | Leu | ATG | TTG |

〔参考例 7〕 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7)

α サブユニットの 77 番目の Thr を Ser に置換するために、pP T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0074】

参考例 1 で調製した pP T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 16 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 7 を得た。

【0075】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0076】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 7 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 77 番目の Thr が Ser に置換されていた。

【0077】

【表 7】

表 7

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 7 | α -77番目 | Thr | Ser | ACC | TCC |

【参考例 8】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8)
 α サブユニットの 90 番目の Gly を Ala に置換するために、pP T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0078】

参考例 1 で調製した pP T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 17 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 を得た。

【0079】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0080】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表8に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの90番目のGlyがAlaに置換されていた。

【0081】

【表8】

表8

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 8 | α -90番目 | Gly | Ala | GGC | GCC |

【参考例9】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(9)

α サブユニットの102番目のValをAlaに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0082】

参考例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 18記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反

応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 9を得た。

【0083】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0084】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表9に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの102番目のValがAlaに置換されていた。

【0085】

【表9】

表9

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 9 | α -102番目 | Val | Ala | GTC | GCC |

【参考例10】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（10）

α サブユニットの106番目のValをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0086】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型と

して2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：19記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 10を得た。

【0087】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0088】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表10に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの106番目のValがIleに置換されていた。

【0089】

【表10】

表10

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 10 | α -106番目 | Val | Ile | GTC | ATC |

【参考例11】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (11)

α サブユニットの126番目のPheをTyrに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0090】

参考例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 20記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 11を得た。

【0091】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0092】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表11に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの126番目のPheがTyrに置換されていた。

【0093】

【表11】

表11

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 11 | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【参考例12】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（12）

α サブユニットの130番目のGlnをGluに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0094】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：21記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 12を得た。

【0095】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0096】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表12に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの130番目のGlnがGluに置換されていた。

【0097】

【表12】

表12

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 12 | α -130番目 | Gln | Glu | CAG | GAG |

【参考例13】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（13）

α サブユニットの142番目のLeuをValに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0098】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 22記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 13を得た。

【0099】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0100】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表13に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの142番目のLeuがValに置換されていた。

【0101】

【表 13】

表 13

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 13 | α -142番目 | Leu | Val | CTG | GTG |

【参考例 14】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (14)

α サブユニットの 146 番目の Glu を Asp に置換するために、pP T-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0102】

参考例 1 で調製した pP T-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 23 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 14 を得た。

【0103】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0104】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表14に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの α サブユニットの146番目のGluがAspに置換されていた。

【0105】

【表14】

表14

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 14 | α -146番目 | Glu | Asp | GAG | GAC |

【参考例15】ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（15）

α サブユニットの187番目のAlaをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0106】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：24記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 15を得た。

【0107】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0108】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表15に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの187番目のAlaがThrに置換されていた。

【0109】

【表15】

表15

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 15 | α -187番目 | Ala | Thr | GCC | ACC |

〔参考例16〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（16）

α サブユニットの194番目のSerをLeuに置換するために、pP-T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0110】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 25記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 16を得た。

【0111】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0112】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表16に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの α サブユニットの194番目のSerがLeuに置換されていた。

【0113】

【表 16】

表 16

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 16 | α -194番目 | Ser | Leu | TCG | TTG |

【参考例 17】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (17)

α サブユニットの 203 番目の Ala を Glu に置換するために、pP T-D B1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0114】

参考例 1 で調製した pP T-D B1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 26 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 17 を得た。

【0115】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0116】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表17に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの203番目のAlaがGluに置換されていた。

【0117】

【表17】

表17

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 17 | α -203番目 | Ala | Glu | GCG | GAG |

【参考例18】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（18）

β サブユニットの20番目のAlaをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：27記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pm

o 1 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 18 を得た。

【0118】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0119】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 18 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 20 番目の Ala が Val に変換されていた。

【0120】

【表 18】

表 18

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 18 | β -20 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |

〔参考例 19〕 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（19）

β サブユニットの 21 番目の Asp を Asn に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0121】

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 28 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 19 を得た。

【0122】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0123】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 19 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの β サブユニットの 21 番目の A s p が A s n に置換されていた。

【0124】

【表 19】

表 19

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 19 | β -21番目 | A s p | A s n | G A C | A A C |

【参考例 20】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (20)

β サブユニットの108番目のGluをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0125】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 29記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 20を得た。

【0126】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0127】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表20に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの108番目のGluがAspに置換されていた。

【0128】

【表20】

表20

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 20 | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |

〔参考例21〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（21）

β サブユニットの108番目のGluをProに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0129】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：30記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 21を得た。

【0130】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0131】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表21に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの108番目のGluがProに置換されていた。

【0132】

【表21】

表21

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 21 | β -108番目 | Glu | Pro | GAG | CCG |

〔参考例22〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（22）

β サブユニットの108番目のGluをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0133】

参考例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 31記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 22を得た。

【0134】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0135】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表22に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの108番目のGluがSerに置換されていた。

【0136】

【表 2 2】

表 2 2

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 22 | β -108番目 | G l u | S e r | G A G | T C G |

【参考例 2 3】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (23)

β サブユニットの108番目のG l uをA r gに置換するために、p P T-D B 1 プラスミドDNAを鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0137】

参考例 1 で調製したp P T-D B 1 のプラスミドDNA 10 n g を各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 32記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 p m o l 含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 p m o l 含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体No. 23を得た。

【0138】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0139】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表23に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの108番目のGluがArgに置換されていた。

【0140】

【表23】

表23

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 23 | β -108番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |

〔参考例24〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（24）

β サブユニットの108番目のGluをCysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0141】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：33記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 24を得た。

【0142】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0143】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表24に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの108番目のGluがCysに置換されていた。

【0144】

【表24】

表24

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 24 | β -108番目 | Glu | Cys | GAG | TGC |

〔参考例25〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（25）

β サブユニットの108番目のGluをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0145】

参考例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 34記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 25を得た。

【0146】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0147】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表25に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの108番目のGluがLeuに置換されていた。

【0148】

【表 25】

表 25

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 25 | β -108番目 | Glu | Leu | GAG | CTG |

【参考例 26】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (26)

β サブユニットの108番目のGluをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0149】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 35記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 26を得た。

【0150】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0151】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表26に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの108番目のGluがThrに置換されていた。

【0152】

【表26】

表26

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 26 | β -108番目 | Glu | Thr | GAG | ACG |

【参考例27】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（27）

β サブユニットの200番目のAlaをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0153】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：36記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 27を得た。

【0154】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0155】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表27に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの200番目のAlaがAspに置換されていた。

【0156】

【表27】

表27

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 27 | β -200番目 | Ala | Asp | GCC | GAC |

〔参考例28〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（28）

β サブユニットの200番目のAlaをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0157】

参考例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 37記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 28を得た。

【0158】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0159】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表28に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの200番目のAlaがIleに置換されていた。

【0160】

【表 28】

表 28

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 28 | β -200番目 | Ala | Ile | GCC | ATC |

【参考例 29】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (29)

β サブユニットの 200 番目の Ala を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0161】

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 38 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 29 を得た。

【0162】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0163】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表29に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの200番目のAlaがValに置換されていた。

【0164】

【表29】

表29

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 29 | β -200番目 | Ala | Val | GCC | GTC |

【参考例30】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（30）

β サブユニットの200番目のAlaをGluに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0165】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：39記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 30を得た。

【0166】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0167】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表30に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの200番目のAlaがGluに置換されていた。

【0168】

【表30】

表30

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 30 | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAG |

〔参考例31〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（31）

β サブユニットの212番目のSerをTyrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0169】

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 40記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 31を得た。

【0170】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0171】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表31に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの β サブユニットの212番目のSerがTyrに置換されていた。

【0172】

【表 3 1】

表 3 1

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 31 | β -212番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【参考例 3 2】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (32)

クローン No. 5 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 19 番目: Ala が Val) とクローン No. 11 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 126 番目: Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0173】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 11 で得られたクローン No. 11 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 11 のプラスミド DNA を調製した。

【0174】

クローン No. 11 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 14 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MU

T4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー R V（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 32 を得た。

【0175】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0176】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 32 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 19 番目の Ala が Val に、 α サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0177】

【表 32】

表 32

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 32 | α -19 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【参考例 33】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（33）

クローンNo. 1のアミノ酸変異 (α サブユニットの6番目: LeuがMet) とクローンNo. 32のアミノ酸変異 (α サブユニットの19番目のAlaがVal; α サブユニットの126番目のPheがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0178】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例32で得られたクローンNo. 32を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 32のプラスミドDNAを調製した。

【0179】

クローンNo. 32のプラスミドDNA 1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 7記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 33を得た。

【0180】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0181】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表33に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがMetに、 α サブユニットの19番目のAlaがValに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0182】

【表33】

表33

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 33 | α -6番目 | Leu | Met | CTG | ATG |
| | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【参考例34】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（34）

クローンNo. 2のアミノ酸変異（ α サブユニットの6番目：LeuがThr）とクローンNo. 32のアミノ酸変異（ α サブユニットの19番目のAlaがVal； α サブユニットの126番目のPheがTyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0183】

参考例33で調製したクローンNo. 32のプラスミドDNA1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

11記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 34を得た。

【0184】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0185】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表34に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがThrに、 α サブユニットの19番目のAlaがValに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0186】

【表 34】

表 34

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 34 | α -6 番目 | Leu | Thr | CTG | ACG |
| | α -19 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【参考例 35】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (35)

クローン No. 3 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 6 番目: Leu が Ala) とクローン No. 32 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 19 番目の Ala が Val; α サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0187】

参考例 33 で調製したクローン No. 32 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 12 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認でき

た。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 35を得た。

【0188】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0189】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表35に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のLeuがAlaに、 α サブユニットの19番目のAlaがValに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0190】

【表35】

表35

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 35 | α -6番目 | Leu | Ala | CTG | GCG |
| | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【参考例36】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（36）

クローンNo. 20のアミノ酸変異（ β サブユニットの108番目：GluがAsp）とクローンNo. 31のアミノ酸変異（ β サブユニットの212番目：SerがTyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0191】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例31で得られたクローンNo. 31を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 31のプラスミドDNAを調製した。

【0192】

クローンNo. 31のプラスミドDNA 1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：29記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 36を得た。

【0193】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0194】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表36に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの β サブ

ユニットの108番目のG l uがA s pに、 β サブユニットの212番目のS e rがT y rにそれぞれ置換されていた。

【0195】

【表36】

表36

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 36 | β -108番目 | G l u | A s p | GAG | GAT |
| | β -212番目 | S e r | T y r | TCC | TAC |

【参考例37】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（37）

クローンNo. 23のアミノ酸変異（ β サブユニットの108番目：G l uがA r g）とクローンNo. 31のアミノ酸変異（ β サブユニットの212番目：S e rがT y r）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0196】

参考例36で調製したクローンNo. 31のプラスミドDNA 1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：32記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反

応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 37 を得た。

【0197】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0198】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 37 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 β サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0199】

【表 37】

表 37

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 37 | β -108 番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |
| | β -212 番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

〔参考例 38〕 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（38）

クローン No. 27 のアミノ酸変異（ β サブユニットの 200 番目：Ala が Asp）とクローン No. 31 のアミノ酸変異（ β サブユニットの 212 番目：Ser が Tyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0200】

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 36 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 38 を得た。

【0201】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0202】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 38 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 200 番目の Ala が Asp に、 β サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0203】

【表 38】

表 38

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 38 | β -200番目 | A l a | A s p | G C C | G A C |
| | β -212番目 | S e r | T y r | T C C | T A C |

【参考例 39】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (39)

クローン No. 30 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 200 番目: A l a が G l u) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 212 番目: S e r が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0204】

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA $1 \mu\text{g}$ を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番 39 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 $50 \mu\text{l}$ の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 $50 \mu\text{l}$ の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 $5 \mu\text{l}$ を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 39 を得た。

【0205】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0206】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表39に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの200番目のAlaがGluに、 β サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0207】

【表39】

表39

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 39 | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAG |
| | β -212番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【実施例1】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (40)

α サブユニットの36番目のThrをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキットの原理及び操作方法を踏襲した。

30mLの試験管に10mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mLとなるよう

にアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

【0208】

各々10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：41記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50μLの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5μLずつ含む全量47.5μLのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98℃）を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTakara LA Taqを0.5μL加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol加えて全量を50μLとした後、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すこと

によるPCR反応No. 3を行った。PCR反応No. 3の反応終了液5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2 KbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1 g）を細かく粉砕し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。精製した約2 kbの増幅DNA断片を制限酵素E c o R I及びH i n d I I Iにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。同様に、E c o R I及びH i n d I I Iによりp P T-D B 1を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7 KbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約0.1 g）を細かく粉砕し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10 μ LのTEに溶解した。この様にして得られた約2 kbと約2.7 KbのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌H B 101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 40を得た。

【0209】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0210】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表40に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サ

プユニットの36番目のThrがMetに置換されている事を確認した。

【0211】

【表40】

表40

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 40 | α -36番目 | Thr | Met | ACG | ATG |

【実施例2】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (41)

α サブユニットの71番目のArgをHisに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0212】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 42記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 41を得た。

【0213】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

【0214】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表41に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの71番目のArgがHisに置換されている事を確認した。

【0215】

【表41】

表4.1

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 41 | α -71番目 | Arg | His | CGT | CAT |

【実施例3】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(42)

α サブユニットの148番目のGlyをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 43記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終

了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 42 を得た。

【0216】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0217】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 42 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 148 番目の Gly が Asp に置換されている事を確認した。

【0218】

【表 42】

表 42

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 42 | α -148 番目 | Gly | Asp | GGC | GAC |

【実施例 4】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（43）

α サブユニットの 204 番目の Val を Arg に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0219】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：44 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 43を得た。

【0220】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0221】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表43に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのαサブユニットの204番目のValがArgに置換されている事を確認した。

【0222】

【表43】

表43

| クローン番号 | 変異箇所 (αサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 43 | α-204番目 | Val | Arg | GTC | CGC |

【実施例5】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(44)

αサブユニットの204番目のValをLysに置換するために、pPTE-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な

変異導入を行った。

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号: 45 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 44 を得た。

【0223】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

【0224】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 44 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 204 番目の V a l が L y s に置換されている事を確認した。

【0225】

【表 4 4】

表 4 4

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 44 | α -204番目 | Val | Lys | GTC | AAA |

【実施例 6】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (45)

α サブユニットの 204 番目の Val を Trp に置換するために、pP T-D B1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pP T-D B1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 46 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 45 を得た。

【0226】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0227】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続い

て、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表45に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの204番目のValがTrpに置換されている事を確認した。

【0228】

【表45】

表45

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 45 | α -204番目 | Val | Trp | GTC | TGG |

【実施例7】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (46)

α サブユニットの204番目のValをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0229】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 47記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。

。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 46 を得た。

【0230】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0231】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 46 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 204 番目の Val が Thr に置換されている事を確認した。

【0232】

【表 46】

表 46

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 46 | α -204 番目 | Val | Thr | GTC | ACC |

〔実施例 8〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (47)

β サブユニットの 10 番目の Thr を Asp に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0233】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 48 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR

反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 47を得た。

【0234】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0235】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表47に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの10番目のThrがAspに置換されている事を確認した。

【0236】

【表47】

表47

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 47 | β -10番目 | Thr | Asp | ACC | GAC |

〔実施例9〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（48）

β サブユニットの10番目のThrをGluに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0237】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 49 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 48 を得た。

【0238】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0239】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 48 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 10 番目の T h r が G l u に置換されている事を確認した。

【0240】

【表 48】

表 48

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 48 | β - 10 番目 | T h r | G l u | A C C | G A A |

[実施例 10] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (49)

β サブユニットの 10 番目の Thr を Trp に置換するために、pP T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0241】

実施例 1 で調製した pP T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 50 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 49 を得た。

【0242】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0243】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 49 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 10 番目の Thr が Trp に置換されている事を確認した。

【0244】

【表 4 9】

表 4 9

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|------|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 49 | β -10番目 | Th r | Tr p | ACC | TGG |

【実施例 11】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (50)

β サブユニットの10番目のTh rをG l yに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0245】

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 51記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 50を得た。

【0246】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0247】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 50 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 10 番目の Thr が Gly に置換されている事を確認した。

【0248】

【表 50】

表 50

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 50 | β -10 番目 | Thr | Gly | ACC | GGC |

【実施例 12】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (51)

β サブユニットの 10 番目の Thr を Tyr に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0249】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：52 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 51を得た。

【0250】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0251】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表51に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの10番目のThrがTyrに置換されている事を確認した。

【0252】

【表51】

表51

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 51 | β-10番目 | Thr | Tyr | ACC | TAC |

【実施例13】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（52）

βサブユニットの10番目のThrをCysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0253】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：53記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 52を得た。

【0254】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0255】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表52に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの10番目のThrがCysに置換されている事を確認した。

【0256】

【表52】

表52

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 52 | β -10番目 | Thr | Cys | ACC | TGC |

[実施例14] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (53)

β サブユニットの32番目のValをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0257】

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 54記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 53を得た。

【0258】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0259】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表53に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの32番目のValがGlyに置換されている事を確認した。

【0260】

【表 5 3】

表 5 3

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 53 | β -32 番目 | Val | Gly | GTC | GGC |

【実施例 15】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (54)

β サブユニットの 37 番目の Phe を Thr に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0261】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 55 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 54 を得た。

【0262】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0263】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 54 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 37 番目の P h e が T h r に置換されている事を確認した。

【0264】

【表 54】

表 54

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 54 | β -37 番目 | P h e | T h r | T T C | A C C |

【実施例 16】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (55)

β サブユニットの 37 番目の P h e を A l a に置換するために、p P T-D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0265】

実施例 1 で調製した p P T-D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 56 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 55を得た。

【0266】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0267】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表55に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの37番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

【0268】

【表55】

表55

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 55 | β-37番目 | Phe | Ala | TTC | GCC |

【実施例17】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（56）

βサブユニットの37番目のPheをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0269】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：57記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 56を得た。

【0270】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0271】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表56に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの37番目のPheがLeuに置換されている事を確認した。

【0272】

【表56】

表56

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 56 | β -37番目 | Phe | Leu | TTC | CTC |

[実施例18] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (57)

β サブユニットの37番目のPheをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0273】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 58記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 57を得た。

【0274】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0275】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表57に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの37番目のPheがIleに置換されている事を確認した。

【0276】

【表 57】

表 57

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 57 | β -37 番目 | P h e | I l e | T T C | A T C |

【実施例 19】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (58)

β サブユニットの 37 番目の P h e を V a l に置換するために、p P T-D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0277】

実施例 1 で調製した p P T-D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 59 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 58 を得た。

【0278】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0279】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 58 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 37 番目の P h e が V a l に置換されている事を確認した。

【0280】

【表 58】

表 58

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 58 | β -37 番目 | P h e | V a l | T T C | G T C |

【実施例 20】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (59)

β サブユニットの 41 番目の P h e を G l u に置換するために、p P T-D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0281】

実施例 1 で調製した p P T-D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 60 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 59を得た。

【0282】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0283】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表59に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの41番目のPheがGluに置換されている事を確認した。

【0284】

【表59】

表59

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 59 | β -41番目 | Phe | Glu | TTC | GAA |

【実施例21】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（60）

β サブユニットの41番目のPheをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0285】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：61記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 60を得た。

【0286】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0287】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表60に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの41番目のPheがThrに置換されている事を確認した。

【0288】

【表60】

表60

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 60 | β -41番目 | Phe | Thr | TTC | ACC |

〔実施例22〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (61)

β サブユニットの41番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0289】

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：62記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 61を得た。

【0290】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0291】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表61に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの41番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

【0292】

【表 6 1】

表 6 1

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 61 | β -41番目 | P h e | A l a | T T C | G C C |

【実施例 2 3】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (62)

β サブユニットの41番目のP h eをL e uに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0293】

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 63記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 62を得た。

【0294】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0295】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 62 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 41 番目の P h e が L e u に置換されている事を確認した。

【0296】

【表 62】

表 62

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 62 | β -41 番目 | P h e | L e u | T T C | C T C |

【実施例 24】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (63)

β サブユニットの 41 番目の P h e を I l e に置換するために、p P T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0297】

実施例 1 で調製した p P T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 64 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 63を得た。

【0298】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0299】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表63に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの41番目のPheがIleに置換されている事を確認した。

【0300】

【表63】

表63

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 63 | β-41番目 | Phe | Ile | TTC | ATC |

【実施例25】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（64）

βサブユニットの41番目のPheをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0301】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：65記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 64を得た。

【0302】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0303】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表64に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの41番目のPheがValに置換されている事を確認した。

【0304】

【表64】

表64

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 64 | β -41番目 | Phe | Val | TTC | GTC |

【実施例26】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（65）

β サブユニットの46番目のMetをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0305】

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 66記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 65を得た。

【0306】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0307】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表65に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの46番目のMetがGlyに置換されている事を確認した。

【0308】

【表 65】

表 65

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 65 | β -46番目 | Met | Gly | ATG | GGG |

【実施例 27】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (66)

β サブユニットの46番目のMetをTyrに置換するために、pP T-DB 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0309】

実施例1で調製したpP T-DB 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 67記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 66を得た。

【0310】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0311】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 66 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 46 番目の Met が Tyr に置換されている事を確認した。

【0312】

【表 66】

表 66

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 66 | β -46 番目 | Met | Tyr | ATG | TAT |

【実施例 28】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (67)

β サブユニットの 46 番目の Met を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0313】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 68 記載のプライマー及び M13 プライマー-M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー-RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 67を得た。

【0314】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0315】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表67に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの46番目のMetがLeuに置換されている事を確認した。

【0316】

【表67】

表67

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 67 | β-46番目 | Met | Leu | ATG | CTG |

【実施例29】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（68）

βサブユニットの46番目のMetをLysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0317】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：69記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 68を得た。

【0318】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0319】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表68に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの46番目のMetがLysに置換されている事を確認した。

【0320】

【表68】

表68

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 68 | β -46番目 | Met | Lys | ATG | AAG |

【実施例30】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (69)

β サブユニットの46番目のMetをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0321】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 70記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 69を得た。

【0322】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0323】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表69に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの46番目のMetがAspに置換されている事を確認した。

【0324】

【表 69】

表 69

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 69 | β -46番目 | Met | Asp | ATG | GAT |

【実施例 31】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (70)

β サブユニットの48番目のLeuをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0325】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 71記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 70を得た。

【0326】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0327】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 70 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 48 番目の Leu が Gly に置換されている事を確認した。

【0328】

【表 70】

表 70

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 70 | β -48 番目 | Leu | Gly | CTG | GGG |

【実施例 32】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (71)

β サブユニットの 48 番目の Leu を Ala に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0329】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 72 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 71を得た。

【0330】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0331】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表71に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの48番目のLeuがAlaに置換されている事を確認した。

【0332】

【表71】

表71

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 71 | β-48番目 | Leu | Ala | CTG | GCG |

【実施例33】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（72）

βサブユニットの48番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0333】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：73記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 72を得た。

【0334】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0335】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表72に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの48番目のLeuがValに置換されている事を確認した。

【0336】

【表72】

表72

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 72 | β -48番目 | Leu | Val | CTG | GTG |

【実施例34】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (73)

β サブユニットの48番目のLeuをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0337】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 74記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 73を得た。

【0338】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0339】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表73に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの48番目のLeuがSerに置換されている事を確認した。

【0340】

【表 7 3】

表 7 3

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 73 | β -48番目 | L e u | S e r | CTG | TCG |

【実施例 3 5】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (74)

β サブユニットの48番目のL e uをT h rに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0341】

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 75記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 74を得た。

【0342】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0343】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 74 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 48 番目の Leu が Thr に置換されている事を確認した。

【0344】

【表 74】

表 74

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 74 | β -48 番目 | Leu | Thr | CTG | ACG |

【実施例 36】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (75)

β サブユニットの 48 番目の Leu を Arg に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0345】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 76 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 75を得た。

【0346】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0347】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表75に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの48番目のLeuがArgに置換されている事を確認した。

【0348】

【表75】

表75

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 75 | β-48番目 | Leu | Arg | CTG | CGG |

【実施例37】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（76）

βサブユニットの51番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0349】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：77記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 76 を得た。

【0350】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0351】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 76 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 51 番目の Phe が Ala に置換されている事を確認した。

【0352】

【表 76】

表 76

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 76 | β -51 番目 | Phe | Ala | TTC | GCC |

〔実施例 38〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (77)

β サブユニットの 51 番目の Phe を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0353】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 78記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 77を得た。

【0354】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0355】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表77に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの51番目のPheがValに置換されている事を確認した。

【0356】

【表 77】

表 77

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 77 | β -51 番目 | P h e | V a l | T T C | G T C |

【実施例 39】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (78)

β サブユニットの 72 番目の T r p を P h e に置換するために、p P T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0357】

実施例 1 で調製した p P T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：79 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー R V (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 78 を得た。

【0358】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0359】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 78 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 72 番目の Trp が Phe に置換されている事を確認した。

【0360】

【表 78】

表 78

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 78 | β -72 番目 | Trp | Phe | TGG | TTT |

【実施例 40】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (79)

β サブユニットの 118 番目の Phe を Ala に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0361】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 80 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 79を得た。

【0362】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0363】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表79に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの118番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

【0364】

【表79】

表79

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 79 | β-118番目 | Phe | Ala | TTC | GCC |

〔実施例41〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（80）

βサブユニットの118番目のPheをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0365】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：81記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 80を得た。

【0366】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0367】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表80に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの118番目のPheがLeuに置換されている事を確認した。

【0368】

【表80】

表80

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 80 | β -118番目 | Phe | Leu | TTC | CTC |

【実施例42】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (81)

β サブユニットの118番目のPheをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0369】

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 82記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 81を得た。

【0370】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0371】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表81に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの118番目のPheがIleに置換されている事を確認した。

【0372】

【表 8 1】

表 8 1

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 81 | β -118番目 | P h e | I l e | T T C | A T C |

【実施例 4 3】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（82）

β サブユニットの118番目のP h eをV a lに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0373】

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：83記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 82を得た。

【0374】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0375】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 82 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 118 番目の Phe が Val に置換されている事を確認した。

【0376】

【表 82】

表 82

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 82 | β -118 番目 | Phe | Val | TTC | GTC |

【実施例 44】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (83)

β サブユニットの 127 番目の Leu を Ala に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0377】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 84 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 83を得た。

【0378】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0379】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表83に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの127番目のLeuがAlaに置換されている事を確認した。

【0380】

【表83】

表83

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 83 | β-127番目 | Leu | Ala | CTG | GCG |

【実施例45】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（84）

βサブユニットの127番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0381】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：85記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 84を得た。

【0382】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0383】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表84に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの127番目のLeuがValに置換されている事を確認した。

【0384】

【表84】

表84

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 84 | β -127番目 | Leu | Val | CTG | GTG |

〔実施例46〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (85)

β サブユニットの127番目のLeuをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0385】

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 86記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 85を得た。

【0386】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0387】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表85に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの127番目のLeuがSerに置換されている事を確認した。

【0388】

【表 8 5】

表 8 5

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-------|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 85 | β -127番目 | L e u | S e r | CTG | TCG |

【実施例 4 7】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（86）

β サブユニットの146番目のA r gをG l yに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例 1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0389】

実施例 1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA 10 n gを各々鋳型として2種類のP C R反応を行った。P C R反応No. 1は、配列表の配列番号：87記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。P C R反応No. 2は、M U T 4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーR V（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R反応No. 1と同様の操作により行った。P C R反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例 1と全く同じ操作により、形質転換体No. 86を得た。

【0390】

次に、参考例 1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0391】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 86 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 146 番目の Arg が Gly に置換されている事を確認した。

【0392】

【表 86】

表 86

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 86 | β -146 番目 | Arg | Gly | CGG | GGG |

【実施例 48】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (87)

β サブユニットの 160 番目の Arg を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0393】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 88 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 87を得た。

【0394】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0395】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表87に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの160番目のArgがLeuに置換されている事を確認した。

【0396】

【表87】

表87

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 87 | β -160番目 | Arg | Leu | CGG | CTG |

【実施例49】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(88)

β サブユニットの160番目のArgをTrpに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0397】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 89記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反

応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 88 を得た。

【0398】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0399】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 88 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 160 番目の Arg が Trp に置換されている事を確認した。

【0400】

【表 88】

表 88

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 88 | β -160 番目 | Arg | Trp | CGG | TGG |

〔実施例 50〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (89)

β サブユニットの 186 番目の Leu を Glu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0401】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 90 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 89 を得た。

【0402】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0403】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 89 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 186 番目の L e u が G l u に置換されている事を確認した。

【0404】

【表 89】

表 89

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 89 | β-186番目 | L e u | G l u | C T G | G A G |

【実施例 51】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (90)

βサブユニットの186番目のL e uをA s pに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0405】

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA 10 n gを各々鋳型として2種類のP C R反応を行った。P C R反応No. 1は、配列表の配列番号：91記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。P C R反応No. 2は、M U T 4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーR V（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50 μ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R反応No. 1と同様の操作により行った。P C R反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 90を得た。

【0406】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0407】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 90 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 186 番目の Leu が Asp に置換されている事を確認した。

【0408】

【表 90】

表 90

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 90 | β -186 番目 | Leu | Asp | CTG | GAT |

【実施例 52】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (91)

β サブユニットの 186 番目の Leu を Lys に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0409】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 92 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 91を得た。

【0410】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0411】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表91に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの186番目のLeuがLysに置換されている事を確認した。

【0412】

【表91】

表91

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 91 | β -186番目 | Leu | Lys | CTG | AAG |

【実施例53】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(92)

β サブユニットの186番目のLeuをArgに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0413】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 93記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98 $^{\circ}$ C)15秒、アニーリング(55 $^{\circ}$ C)30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 92を得た。

【0414】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0415】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表92に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの186番目のLeuがArgに置換されている事を確認した。

【0416】

【表92】

表92

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 92 | β -186番目 | Leu | Arg | CTG | CGG |

〔実施例54〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (93)

β サブユニットの186番目のLeuをAsnに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0417】

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号: 94 記載のプライマー及び M 13 プライマー M 4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M 13 プライマー R V (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 p m o l 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 及び N o . 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o . 93 を得た。

【0418】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0419】

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 93 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 186 番目の L e u が A s n に置換されている事を確認した。

【0420】

【表 9 3】

表 9 3

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 93 | β-186番目 | Leu | Asn | CTG | AAC |

【実施例 5 5】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (94)

βサブユニットの186番目のLeuをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0421】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 95記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50μLの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50μLの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 94を得た。

【0422】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0423】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 94 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 186 番目の Leu が Ser に置換されている事を確認した。

【0424】

【表 94】

表 94

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 94 | β -186 番目 | Leu | Ser | CTG | TCG |

【実施例 56】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (95)

β サブユニットの 186 番目の Leu を Gly に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0425】

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 96 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5 μ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 95を得た。

【0426】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0427】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表95に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの186番目のLeuがGlyに置換されている事を確認した。

【0428】

【表95】

表95

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 95 | β-186番目 | Leu | Gly | CTG | GGG |

【実施例57】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (96)

βサブユニットの217番目のAspをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

【0429】

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 97記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50μLの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反

応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 μ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応No. 1と同様の操作により行った。PCR 反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 μ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 96を得た。

【0430】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0431】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表96に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの β サブユニットの217番目のAspがGlyに置換されている事を確認した。

【0432】

【表96】

表96

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 96 | β -217番目 | Asp | Gly | GAC | GGC |

〔実施例58〕ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (97)

クローンNo. 40のアミノ酸変異 (α サブユニットの36番目: ThrがMet) とクローンNo. 11のアミノ酸変異 (α サブユニットの126番目: PheがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラー

ゼ活性が保持されていることを確認した。

【0433】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 11 で得られたクローン No. 11 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0434】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 41 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 97 を得た。

【0435】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0436】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 97 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 36 番目の Thr が Met に、 α サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0437】

【表 97】

表 97

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 97 | α -36 番目 α -126 番目 | Thr Phe | Met Tyr | ACG TTC | ATG TAC |

【実施例 59】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (98)

クローン No. 42 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 148 番目: Gly が Asp) とクローン No. 43 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 204 番目: Val が Arg) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0438】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 4 で得られたクローン No. 43 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0439】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 43 記載のプライマー及び M

13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 98 を得た。

【0440】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0441】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 98 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの 14 番目の Gly が Asp に、 α サブユニットの 204 番目の Val が Arg にそれぞれ置換されていた。

【0442】

【表 98】

表 98

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 98 | α -148 番目 | Gly | Asp | GGC | GAC |
| | α -204 番目 | Val | Arg | GTC | CGC |

【実施例 60】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (99)

クローン No. 77 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 51 番目: Phe が Val) とクローン No. 20 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 108 番目: Glu が Asp) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0443】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 20 で得られたクローン No. 20 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0444】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 78 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 99 を得た。

【0445】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0446】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 99 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 51 番目の Phe が Val に、 β サブユニットの 108 番目の Glu が Asp にそれぞれ置換されていた。

【0447】

【表 99】

表 99

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 99 | β -51 番目 β -108 番目 | Phe Glu | Val Asp | TTC GAG | GTC GAT |

【参考例 40】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (100)

クローン No. 20 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 108 番目: Glu が Asp) とクローン No. 30 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 200 番目: Ala が Glu) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0448】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 30 で得られたクローン No. 30 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によ

り菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0449】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 29 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 100 を得た。

【0450】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0451】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 100 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 108 番目の Glu が Asp に、 β サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換されていた。

【0452】

【表100】

表100

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 100 | β -108番目 β -200番目 | Glu Ala | Asp Glu | GAG GCC | GAT GAC |

【実施例61】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (101)

クローンNo. 82のアミノ酸変異 (β サブユニットの118番目: PheがVal) とクローンNo. 30のアミノ酸変異 (β サブユニットの200番目: AlaがGlu) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0453】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例30で得られたクローンNo. 30を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

【0454】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 83記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配

列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 101を得た。

【0455】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0456】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表101に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの118番目のPheがValに、 β サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

【0457】

【表101】

表101

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 101 | β -118番目 | Phe | Val | TTC | GTC |
| | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAC |

【実施例62】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(102)

クローンNo. 88のアミノ酸変異(β サブユニットの160番目: ArgがTrp)とクローンNo. 92のアミノ酸変異(β サブユニットの186番目: LeuがArg)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラー

ーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0458】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 53 で得られたクローン No. 92 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0459】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 89 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 102 を得た。

【0460】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0461】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表102に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの160番目のArgがTrpに、 β サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

【0462】

【表102】

表102

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 102 | β -160番目 β -186番目 | Arg Leu | Trp Arg | CGG CTG | TGG CGG |

【実施例63】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (103)

クローンNo. 2のアミノ酸変異 (α サブユニットの6番目: LeuがThr) とクローンNo. 97のアミノ酸変異 (α サブユニットの36番目: ThrがMet; α サブユニットの126番目: PheがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0463】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例58で得られたクローンNo. 97を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

【0464】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行

った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 11記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号: 8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号: 9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号: 10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 103を得た。

【0465】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0466】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表103に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの α サブユニットの6番目のLeuがThrに、 α サブユニットの36番目のThrがMetに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0467】

【表103】

表103

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 103 | α -6番目 α -36番目 α -126番目 | Leu Thr Phe | Thr Met Tyr | CTG ACG TTC | ACG ATG TAC |

【実施例64】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (104)

クローンNo. 41のアミノ酸変異 (α サブユニットの71番目: ArgがHis) とクローンNo. 32のアミノ酸変異 (α サブユニットの19番目: AlaがVal; α サブユニットの126番目: PheがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0468】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例32で得られたクローンNo. 32を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm \times 5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

【0469】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 42記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プ

ライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 104を得た。

【0470】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0471】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表104に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの19番目のAlaがValに、 α サブユニットの71番目のArgがHisに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0472】

【表104】

表104

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 104 | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -71番目 | Arg | His | CGT | CAT |
| | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |

【実施例65】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（105）

クローンNo. 40のアミノ酸変異（ α サブユニットの36番目：ThrがM

e t) とクローン No. 98 のアミノ酸変異 (α サブユニットの 148 番目: Gly が Asp; α サブユニットの 204 番目: Val が Arg) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0473】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 59 で得られたクローン No. 98 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0474】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 41 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 105 を得た。

【0475】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0476】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表105に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの36番目のThrがMetに、 α サブユニットの148番目のGlyがAspに、 α サブユニットの204番目のValがArgにそれぞれ置換されていた。

【0477】

【表105】

表105

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 105 | α -36番目 | Thr | Met | ACG | ATG |
| | α -148番目 | Gly | Asp | GGC | GAC |
| | α -204番目 | Val | Arg | GTC | CGC |
| | | | | | |

【実施例66】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(106)

クローンNo. 47のアミノ酸変異(β サブユニットの10番目: ThrがAsp)とクローンNo. 101のアミノ酸変異(β サブユニットの118番目: PheがVal; β サブユニットの200番目: AlaがGlu)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0478】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例61で得られたクローンNo. 101を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)に

より菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0479】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：48 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反応（72℃）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 106 を得た。

【0480】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0481】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 106 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの β サブユニットの 10 番目の Thr が Asp に、 β サブユニットの 118 番目の Phe が Val に、 β サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換されていた。

【0482】

【表106】

表106

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 106 | β -10番目 | Thr | Asp | ACC | GAC |
| | β -118番目 | Phe | Val | TTC | GTC |
| | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAC |
| | | | | | |

【実施例67】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (107)

クローンNo. 56のアミノ酸変異 (β サブユニットの37番目: PheがLeu) とクローンNo. 100のアミノ酸変異 (β サブユニットの108番目: GluがAsp; β サブユニットの200番目: AlaがGlu) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0483】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例40で得られたクローンNo. 100を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

【0484】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 57記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プ

ライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 107を得た。

【0485】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0486】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表107に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの37番目のPheがLeuに、 β サブユニットの108番目のGluがAspに、 β サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

【0487】

【表107】

表107

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 107 | β -37番目 | Phe | Leu | TTC | CTC |
| | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |
| | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAC |

【実施例68】ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（108）

クローンNo. 58のアミノ酸変異（ β サブユニットの37番目：PheがV

a 1) とクローン No. 100 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 108 番目: Glu が Asp; β サブユニットの 200 番目: Ala が Glu) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0488】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 40 で得られたクローン No. 100 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0489】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 59 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 108 を得た。

【0490】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0491】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表108に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの37番目のPheがValに、 β サブユニットの108番目のGluがAspに、 β サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

【0492】

【表108】

表108

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 108 | β -37番目 β -108番目 β -200番目 | Phe Glu Ala | Val Asp Glu | TTC GAG GCC | GTC GAT GAC |

[実施例69] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (109)

クローンNo. 63のアミノ酸変異 (β サブユニットの41番目: PheがIle) とクローンNo. 99のアミノ酸変異 (β サブユニットの51番目: PheがVal; β サブユニットの108番目: GluがAsp) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0493】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例60で得られたクローンNo. 99を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) によ

り菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0494】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 64 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 109 を得た。

【0495】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0496】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 109 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの β サブユニットの 41 番目の Phe が Ile に、 β サブユニットの 51 番目の Phe が Val に、 β サブユニットの 108 番目の Glu が Asp にそれぞれ置換されていた。

【0497】

【表109】

表109

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 109 | β -41番目 | Phe | Ile | TTC | ATC |
| | β -51番目 | Phe | Val | TTC | GTC |
| | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |

【実施例70】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (110)

クローンNo. 68のアミノ酸変異 (β サブユニットの46番目: MetがLys) とクローンNo. 37のアミノ酸変異 (β サブユニットの108番目: GluがArg; β サブユニットの212番目: SerがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0498】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例37で得られたクローンNo. 37を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

【0499】

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 69記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 μ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プ

ライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 μ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 μ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 110を得た。

【0500】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0501】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表110に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの β サブユニットの46番目のMetがLysに、 β サブユニットの108番目のGluがArgに、 β サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

【0502】

【表110】

表110

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 110 | β -46番目 | Met | Lys | ATG | AAG |
| | β -108番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |
| | β -212番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【実施例71】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（111）

クローンNo. 72のアミノ酸変異（ β サブユニットの48番目：LeuがV

a1) とクローン No. 37 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 108 番目: Glu が Arg; β サブユニットの 212 番目: Ser が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0503】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 37 で得られたクローン No. 37 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0504】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 73 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 111 を得た。

【0505】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0506】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 111 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 48 番目の Leu が Val に、 β サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 β サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0507】

【表 111】

表 111

| クローン番号 | 変異箇所 (β サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 111 | β -48 番目 | Leu | Val | CTG | GTG |
| | β -108 番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |
| | β -212 番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【実施例 72】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (112)

クローン No. 85 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 127 番目: Leu が Ser) と クローン No. 102 のアミノ酸変異 (β サブユニットの 160 番目: Arg が Trp; β サブユニットの 186 番目: Leu が Arg) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0508】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 62 で得られたクローン No. 102 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) に

より菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

【0509】

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 86 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 112 を得た。

【0510】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0511】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 112 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの β サブユニットの 127 番目の Leu が Ser に、 β サブユニットの 160 番目の Arg が Trp に、 β サブユニットの 186 番目の Leu が Arg にそれぞれ置換されていた。

【0512】

【表 112】

表 112

| クローン番号 | 変異箇所 (βサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|--------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 112 | β-127番目 | L e u | S e r | CTG | T C G |
| | β-160番目 | A r g | T r p | CGG | T G G |
| | β-186番目 | L e u | A r g | CTG | C G G |
| | | | | | |

【実施例 73】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (113)

クローン No. 34 のアミノ酸変異とクローン No. 110 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0513】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μg/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 34 で得られたクローン No. 34 および実施例 70 で得られたクローン No. 110 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 34 及びクローン No. 110 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0514】

クローン No. 110 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 34 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切りだした両アガロ

ース片 (約 0.1 g) を細かく粉碎し 1 ml の TE 溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μ l の TE に溶解した。

【0515】

この様にして得られたクローン No. 110 由来の約 770 bp の DNA 断片とクローン No. 34 由来の約 3.8 Kbp の DNA 断片を DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 HB101 のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体 No. 113 を得た。

【0516】

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

【0517】

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 113 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの α サブユニットの 6 番目の Leu が Thr に、 α サブユニットの 19 番目の Ala が Val に、 α サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr に、 β サブユニットの 46 番目の Met が Lys に、 β サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 β サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

【0518】

【表 113】

表 113

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 113 | α -6 番目 | Leu | Thr | CTG | ACG |
| | α -19 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -46 番目 | Met | Lys | ATG | AAG |
| | β -108 番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |
| | β -212 番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【実施例 74】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (114)

クローン No. 34 のアミノ酸変異とクローン No. 111 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0519】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 34 で得られたクローン No. 34 および実施例 71 で得られたクローン No. 111 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 34 及びクローン No. 111 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0520】

クローン No. 111 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ VII 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 34 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社

製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b pのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 m lのT E溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのT Eに溶解した。

【0521】

この様にして得られたクローンN o. 111由来の約770 b pのDNA断片とクローンN o. 34由来の約3.8 K b pのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌H B 101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体N o. 114を得た。

【0522】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0523】

また、上記菌体からアルカリS D S抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373 Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表114に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のL e uがT h rに、 α サブユニットの19番目のA l aがV a lに、 α サブユニットの126番目のP h eがT y rに、 β サブユニットの48番目のL e uがV a lに、 β サブユニットの108番目のG l uがA r gに、 β サブユニットの212番目のS e rがT y rにそれぞれ置換されていた。

【0524】

【表 114】

表 114

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 114 | α -6 番目 | Leu | Thr | CTG | ACG |
| | α -19 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -48 番目 | Leu | Val | CTG | GTG |
| | β -108 番目 | Glu | Arg | GAG | CGG |
| | β -212 番目 | Ser | Tyr | TCC | TAC |

【実施例 75】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得

クローン No. 35 のアミノ酸変異とクローン No. 112 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0525】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 35 で得られたクローン No. 35 および実施例 72 で得られたクローン No. 112 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm×5 分）によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 35 及びクローン No. 112 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0526】

クローン No. 112 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 1.0 %）を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 35 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7 %）を行い、アガ

ロースゲルから約3.8 kbpのDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのTEに溶解した。

【0527】

この様にして得られたクローンNo. 112由来の約770 bpのDNA断片とクローンNo. 35由来の約3.8 KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 115を得た。

【0528】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0529】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表115に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの α サブユニットの6番目のLeuがAlaに、 α サブユニットの19番目のAlaがValに、 α サブユニットの126番目のPheがTyrに、 β サブユニットの127番目のLeuがSerに、 β サブユニットの160番目のArgがTrpに、 β サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

【0530】

【表 115】

表 115

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 115 | α -6 番目 | Leu | Ala | CTG | GCG |
| | α -19 番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -126 番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -127 番目 | Leu | Ser | CTG | TCG |
| | β -160 番目 | Arg | Trp | CGG | TGG |
| | β -186 番目 | Leu | Arg | CTG | CGG |

【実施例 76】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (118)

クローン No. 103 のアミノ酸変異とクローン No. 106 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0531】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 63 で得られたクローン No. 103 および実施例 66 で得られたクローン No. 106 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 103 及びクローン No. 106 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0532】

クローン No. 106 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ VII 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 103 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ

社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b p のDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 m l のT E 溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ l のT E に溶解した。

【0533】

この様にして得られたクローンNo. 106由来の約770 b p のDNA断片とクローンNo. 103由来の約3.8 K b p のDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 116を得た。

【0534】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0535】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表116に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの6番目のL e u がT h r に、 α サブユニットの36番目のT h r がM e t に、 α サブユニットの126番目のP h e がT y r に、 β サブユニットの10番目のT h r がA s p に、 β サブユニットの118番目のP h e がV a l に、 β サブユニットの200番目のA l a がG l u にそれぞれ置換されていた。

【0536】

【表 116】

表 116

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|------------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 116 | α -6 番目 | L e u | T h r | C T G | A C G |
| | α -36 番目 | T h r | M e t | A C G | A T G |
| | α -126 番目 | P h e | T y r | T T C | T A C |
| | β -10 番目 | T h r | A s p | A C C | G A C |
| | β -118 番目 | P h e | V a l | T T C | G T C |
| | β -200 番目 | A l a | G l u | G C C | G A C |
| | | | | | |

【実施例 77】 ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (119)

クローン No. 104 のアミノ酸変異とクローン No. 107 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

【0537】

30ml の試験管に 10ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 64 で得られたクローン No. 104 および実施例 67 で得られたクローン No. 107 を一白金耳植菌し、37℃・300rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 104 及びクローン No. 107 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0538】

クローン No. 107 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ VII 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 104 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ

社製タイプV I I-低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b pのDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 m lのT E溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのT Eに溶解した。

【0539】

この様にして得られたクローンN o. 107由来の約770 b pのDNA断片とクローンN o. 104由来の約3.8 K b pのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌H B 101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体N o. 117を得た。

【0540】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0541】

また、上記菌体からアルカリS D S抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373 Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表117に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの19番目のA l aがV a lに、 α サブユニットの71番目のA r gがH i sに、 α サブユニットの126番目のP h eがT y rに、 β サブユニットの37番目のP h eがL e uに、 β サブユニットの108番目のG l uがA s pに、 β サブユニットの200番目のA l aがG l uにそれぞれ置換されていた。

【0542】

【表 117】

表 117

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 117 | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -71番目 | Arg | His | CGT | CAT |
| | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -37番目 | Phe | Leu | TTC | CTC |
| | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |
| | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAC |

【実施例 78】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (120)

クローン No. 104 のアミノ酸変異とクローン No. 108 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0543】

30ml の試験管に 10ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 64 で得られたクローン No. 104 および実施例 68 で得られたクローン No. 108 を一白金耳植菌し、37℃・300rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 104 及びクローン No. 108 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0544】

クローン No. 108 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ VII 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 104 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ

社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b pのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 m lのT E溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ lのT Eに溶解した。

【0545】

この様にして得られたクローンNo. 108由来の約770 b pのDNA断片とクローンNo. 104由来の約3.8 K b pのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 118を得た。

【0546】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0547】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表118に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの α サブユニットの19番目のA l aがV a lに、 α サブユニットの71番目のA r gがH i sに、 α サブユニットの126番目のP h eがT y rに、 β サブユニットの37番目のP h eがV a lに、 β サブユニットの108番目のG l uがA s pに、 β サブユニットの200番目のA l aがG l uにそれぞれ置換されていた。

【0548】

【表118】

表118

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 118 | α -19番目 | Ala | Val | GCG | GTG |
| | α -71番目 | Arg | His | CGT | CAT |
| | α -126番目 | Phe | Tyr | TTC | TAC |
| | β -37番目 | Phe | Val | TTC | GTC |
| | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |
| | β -200番目 | Ala | Glu | GCC | GAC |
| | | | | | |

【実施例79】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (119)

クローンNo. 105のアミノ酸変異とクローンNo. 109のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0549】

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例65で得られたクローンNo. 105および実施例69で得られたクローンNo. 109を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 105及びクローンNo. 109のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

【0550】

クローンNo. 109のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用;アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 105のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ

社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b p のDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 m l のT E 溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ l のT E に溶解した。

【0551】

この様にして得られたクローンNo. 109由来の約770 b p のDNA断片とクローンNo. 105由来の約3.8 K b p のDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 119を得た。

【0552】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0553】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表119に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの α サブユニットの36番目のT h r がM e t に、 α サブユニットの148番目のG l y がA s p に、 α サブユニットの204番目のV a l がA r g に、 β サブユニットの41番目のP h e がI l e に、 β サブユニットの51番目のP h e がV a l に、 β サブユニットの108番目のG l u がA s p にそれぞれ置換されていた。

【0554】

【表 119】

表 119

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 119 | α -36番目 | Thr | Met | ACG | ATG |
| | α -148番目 | Gly | Asp | GGC | GAC |
| | α -204番目 | Val | Arg | GTC | CGC |
| | β -41番目 | Phe | Ile | TTC | ATC |
| | β -51番目 | Phe | Val | TTC | GTC |
| | β -108番目 | Glu | Asp | GAG | GAT |

【実施例 80】 ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (120)

クローン No. 98 のアミノ酸変異とクローン No. 100 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

【0555】

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 59 で得られたクローン No. 98 および参考例 40 で得られたクローン No. 100 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 98 及びクローン No. 100 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

【0556】

クローン No. 100 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ VII 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 98 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社

製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8 k b p のDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 m l のT E 溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 μ l のT E に溶解した。

【0557】

この様にして得られたクローンNo. 100由来の約770 b p のDNA断片とクローンNo. 98由来の約3.8 K b p のDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 120を得た。

【0558】

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

【0559】

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表120に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの α サブユニットの148番目のG l y がA s p に、 α サブユニットの204番目のV a l がA r g に、 β サブユニットの108番目のG l u がA s p に、 β サブユニットの200番目のA l a がG l u にそれぞれ置換されていた。

【0560】

【表 120】

表 120

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|---------|-----------------|-----------|-------|---------|-------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 120 | α -148番目 | G l y | A s p | G G C | G A C |
| | α -204番目 | V a l | A r g | G T C | C G C |
| | β -108番目 | G l u | A s p | G A G | G A T |
| | β -200番目 | A l a | G l u | G C C | G A C |

【0561】

【発明の効果】

本発明により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの本質的な機能を変化させる事の無い新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列が提供される。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドを含む形質転換体、該形質転換体を用いた該酵素の産生方法、及び該形質転換体を用いたニトリル化合物からの対応するアミド化合物の製造方法が提供される。

【0562】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC.

<120> Nitrile hydratase

<130>

<160> 97

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..205

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 1

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu

5

10

15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly

20

25

30

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn

35

40

45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr

50

55

60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys

65

70

75

80

Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val

85

90

95

Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser

100

105

110

Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu

115

120

125

Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys

130

135

140

Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp

145

150

155

160

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala
165 170 175

Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg
180 185 190

Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala
195 200 205

<210> 2

<211> 223

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..223

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..223

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 2

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile
5 10 15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val
20 25 30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu
35 40 45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu
50 55 60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly
65 70 75 80
Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln
85 90 95
Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys
100 105 110
Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro
115 120 125
Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val
130 135 140
Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg
145 150 155 160
Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr
165 170 175
Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His
180 185 190
Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly
195 200 205
Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu
210 215 220
Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala
225 230 233
<210> 3
<211> 618
<212> DNA
<213> Pseudonocardia thermophila
<220>
<221> source
<222> 1..618

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..618

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 3

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcgg 60
gtcaaggccc tggagtcgat gtcacatgaa cagggcaccc tcaccacgtc gatgatcgac 120
cggatggccg agatctacga gaacgaggtc ggcccgccacc tcggcgcgaa ggctcgtcgtg 180
aaggcctgga ccgacccgga gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240
aaggagctcg gcatcggcgg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300
gaggtccacc acgtcgtcgt gtgcacgctc tgctcctgct acccgtggcc ggtgctgggg 360
ctgccgccga actggttcaa ggagccgcag taccgctccc gcgtgggtgcg tgagccccgg 420
cagctgctca aggaggagtt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggctctgg 480
gactccagct ccgagatgcg cttcgtcgtc ctcccgacgc gccccgcggg caccgacggg 540
tggagcgagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600
gcgaaggcgg tcgctga 618

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..702

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..702

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"

/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 4

```
atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccgcg 60
gacgaaccgg tcttccgcgc cgagtgggag aaggtcgcgt tcgcgatgtt cccggcgacg 120
ttccggggccg gcttcatggg cctggacgag ttccggttcg gcatcgagca gatgaacccg 180
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240
gtccgcaccg gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300
aaccgacg ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360
caggccgtct acggcgggct gcccgcaagc cgggaggctg accgaccgcc caagttcaag 420
gagggcgacg tgggtgcggtt ctccaccgcg agcccgaagg gccacgcccg gcgcgcgcgg 480
tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccgggac 540
accgccggca acggcctggg cgagtgcgcc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600
caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660
ccctacatcg agtcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702
```

<210> 5

<211> 144

<212> PRT

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

<221> source

<222> 1..144

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..144

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile hydratase"

<220>

<221> INT#MET

<222> 1

<400> 5

Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu
1 5 10 15
Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp
20 25 30
Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe
35 40 45
Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln
50 55 60
Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His
65 70 75 80
Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala
85 90 95
Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu
100 105 110
Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His
115 120 125
His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser
130 135 140

<210> 6

<211> 435

<212> DNA

<213> *Pseudonocardia thermophila*

<220>

<221> source

<222> 1..435

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..435

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile hydratase"

<220>

<221> int#codon

<222> 1..3

<400> 6

gtgagcgccg aggcgaaggt ccgcctgaag cactgcccc a cggccgagga ccgggcggcg 60
gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggcttcgac 120
gagccgtggc agctgcgggc gttcgcgctg gcggtcgcgg cgtgcagggc gggccggttc 180
gagtggaagc agctgcagca ggcgctgac tcctcgatcg gggagtggga gcgcacccac 240
gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcacttcg tcgccgcgct ggaatccgtg 300
ctcggcgagg aagggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360
gccaaccgcg cgaacaagga tcacatgga ccgcatctgg agcccgtcgc ggtccacccc 420
gccgtgcggt cctga 435

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 7

aacatcatgc gcaagtcg

18

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 8

caggaaacag ctatgac

17

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 9

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 10

gttttcccag tcacgac

17

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 11

aacatcacgc gcaagtcg

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 12

aacatcgcg gcaagtcg

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 13

aacatcgtgc gcaagtcg

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 14

atcacggtgc gggtaag

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 15

acgtcgttga tcgaccgg

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 16

gacggctccg aggcctgc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 17

ctgcaggccg aggacatg

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 18

gacgaggccc accacgtc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 19

cacgtcatcg tgtgcacg

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 20

aactggtaca aggagccg

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 21

gagccggagt accgctcc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 22

cggcaggtgc tcaaggag

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 23

aaggaggact tcggcttc

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 24

gagctcacca ccctcgtc

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 25

cgcgagttga tgatcggc

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 26

gcgaaggagg tcgcgtga

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 27

cggcccgtgg acgaaccg

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 28

cccgcaacg aaccggtc

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 29

ctgcccgatc acgagcag

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 30

ctgcccccgac acgagcag

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 31

ctgcccctcgc acgagcag

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 32

ctgccccggc acgagcag

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 33

ctgccctgcc acgagcag

18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 34

ctgcccctgc acgagcag

18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 35

ctgcccacgc acgagcag

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 36

ttcacggacc aggagctg

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 37

ttcacgatcc aggagctg

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 38

ttcacggtcc aggagctg

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 39

ttcacggagc aggagctg

18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 40

ccgaactaca gcgtctac

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 41

ctcaccatgt cgatgac

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 42

aagaagcatc tgctcgcc

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 43

gagttcgact tcgaggtc

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 44

aaggcgcgcg cgtgagcg

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 45

aaggcgaaag cgtgagcg

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 46

aaggcgtggg cgtgagcg

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 47

aaggcgaccg cgtgagcg

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 48

ggcggcgacg atgggctg

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 49

ggcggcgaag atgggctg

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 50

ggcggctggg atgggctg

18

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 51

ggcggcggcg atgggctg

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 52

ggcggctacg atgggctg

18

<210> 53

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 53

ggcggctgcg atgggctg

18

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 54

gagaagggcg cgttcgcg

18

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 55

gcgatgaccc cggcgacg

18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 56

gcgatggccc cggcgacg

18

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 57

gcgatgctcc cggcgacg

18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 58

gcgatgatcc cggcgacg

18

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 59

gcgatggtcc cggcgacg

18

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 60

gcgacggaac gggccggc

18

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 61

gcgacgaccc gggccggc

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 62

gcgacggccc gggccggc

18

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 63

gcgacgctcc gggccggc

18

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 64

gcgacgatcc gggccggc

18

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 65

gcgacggtcc gggccggc

18

<210> 66

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 66

ggcttcgggg gcctggac

18

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 67

ggcttctatg gcctggac

18

<210> 68

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 68

ggcttcctgg gcctggac

18

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 69

ggcttcaagg gcctggac

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 70

ggcttcgatg gcctggac

18

<210> 71

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 71

atgggcgggg acgagttc

18

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 72

atgggcgcgg acgagttc

18

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 73

atgggcgtgg acgagttc

18

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 74

atgggctcgg acgagttc

18

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 75

atgggcacgg acgagttc

18

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 76

atgggccggg acgagttc

18

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 77

gacgaggccc ggttcggc

18

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 78

gacgagtccc ggttcggc

18

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 79

tggcacttta tccgcacc

18

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 80

atcgaggccg tcaaccag

18

<210> 81

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 81

atcgagctcg tcaaccag

18

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 82

atcgagctcg tcaaccag

18

<210> 83

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 83

atcgaggtcg tcaaccag

18

<210> 84

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 84

ggcggggcgc ccgcaagc

18

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 85

ggcggggtgc ccgcaagc

18

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 86

ggcgggtcgc ccgcaagc

18

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 87

gtggtggggt tctccacc

18

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 88

cgcgcgctgt acgtgcgc

18

<210> 89

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 89

cgcgcgtggt acgtgcgc

18

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 90

aacggcgagg gcgagtgc

18

<210> 91

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 91

aacggcgatg gcgagtgc

18

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 92

aacggcaagg gcgagtgc

18

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 93

aacggccggg gcgagtgc

18

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 94

aacggcaacg gcgagtgc

18

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 95

aacggctcgg gcgagtgc

18

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 96

aacggcgggg gcgagtgc

18

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 97

tactacggct gctgggag

18

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミド p P T - D B 1 の制限酵素切断点地図を示す。

【符号の説明】

b l a : β -ラクタマーゼをコードする遺伝子を示す。

C o l E 1 - o r i : C o l E 1 系の複製開始部位を示す。

l a c Z : p U C 1 8 由来のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

N H α : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの α サブユニットをコードする遺伝子を示す。

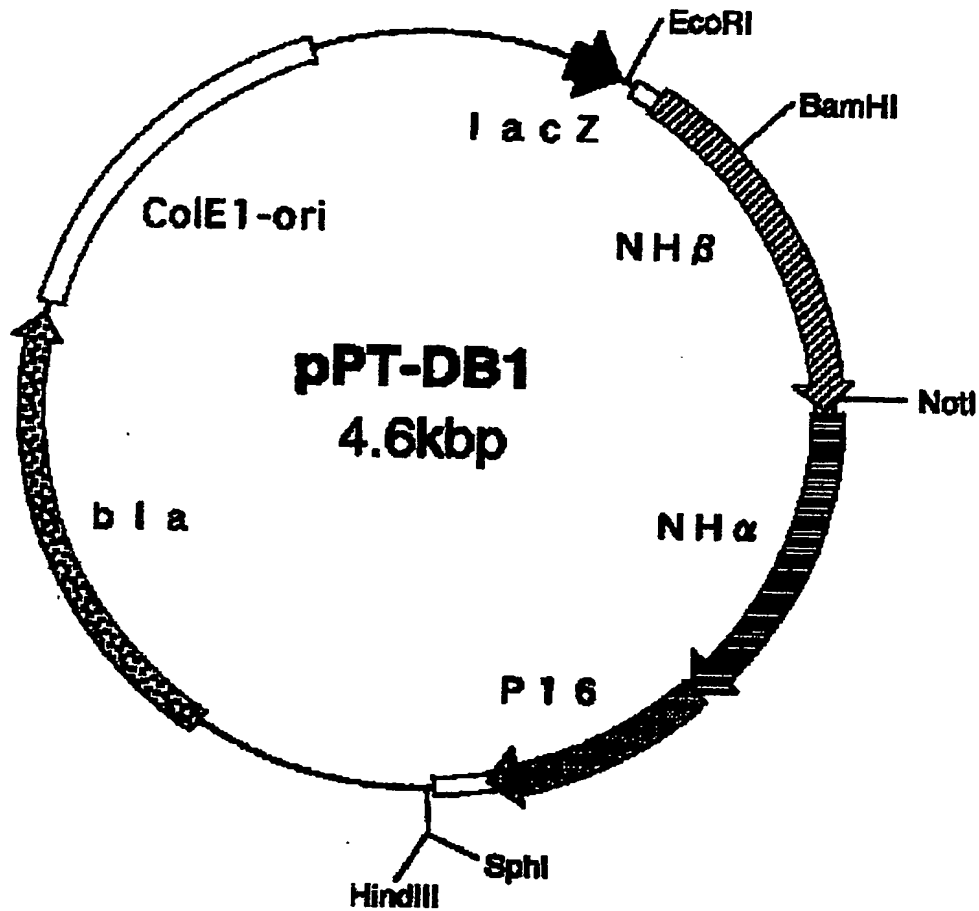
N H β : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの β サブユニットをコードする遺伝子を示す。

P 1 6 : シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関与するタンパク質をコードする遺伝子を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する。

【解決手段】 シュードノカルディア・サーモフィラ *Pseudonocardia thermophila* JCM3095由来であり、ヘテロな2種のサブユニットから構成されるニトリルヒドラーゼに新規な変異を導入し、得られる変異体のアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する。また、該遺伝子が挿入されたプラスミドを作製し、該プラスミドを導入した形質転換体を、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する触媒として用いる。

【効果】 ニトリル化合物を対応するアミド化合物に効率良く変換することが可能となる。

【選択図】 図1

出願人履歴情報

識別番号

[000005887]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1997年10月 1日

名称変更

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

三井化学株式会社

2. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2003年11月 4日

住所変更

東京都港区東新橋一丁目5番2号

三井化学株式会社